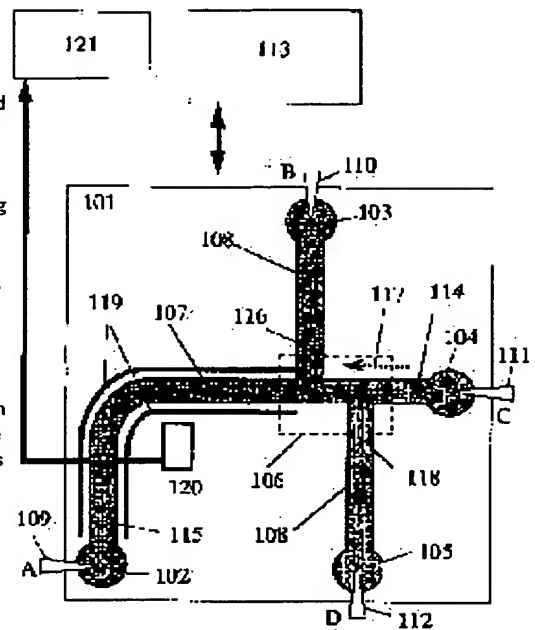


(11)Publication number : 2001-272374  
(43)Date of publication of application : 05.10.2001

G01N 27/447  
C12M 1/00  
G01N 33/561

(72)Inventor : ICHIKI TAKANORI  
UJIE TAKEKAZU  
OKUDA TOMOKO  
HORIKI YASUHIRO



(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-272374

(P2001-272374A)

(43)公開日 平成13年10月5日(2001.10.5)

(51)IntCl.<sup>1</sup>

識別記号

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 27/447

C 1 2 M 1/00

A 4 B 0 2 9

C 1 2 M 1/00

G 0 1 N 33/561

G 0 1 N 33/561

27/26

3 3 1 E

審査請求 未請求 請求項の数9 書面 (全 6 頁)

(21)出願番号 特願2000-131833(P2000-131833)

(22)出願日 平成12年3月27日(2000.3.27)

(71)出願人 599153220

菊地 純

東京都港区白金台2丁目14番地6号

(71)出願人 500201200

一木 隆範

埼玉県坂戸市千代田1丁目25番地14号 サ

ンハイツ喜芳201号

(71)出願人 594169385

堀池 靖浩

東京都西東京市東伏見3丁目2番地12号

(72)発明者 一木 隆範

埼玉県坂戸市千代田1丁目25番地14号 サ

ンハイツ喜芳201号

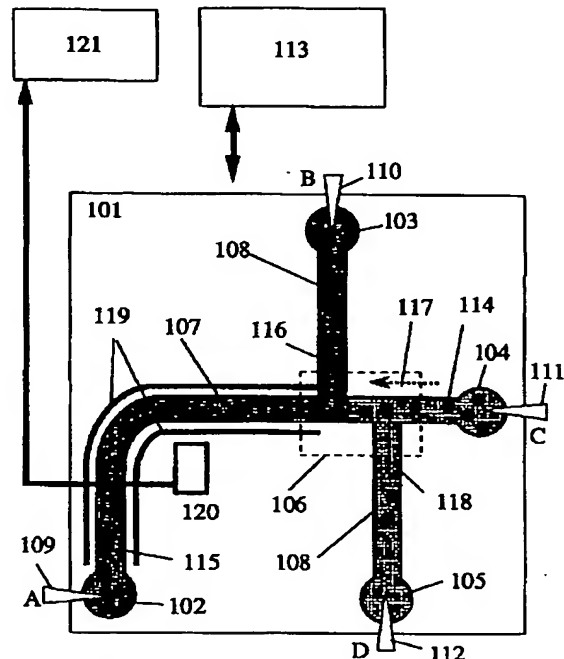
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫分析方法ならびに装置

(57)【要約】

【目的】蛋白質、病原体、細胞などの免疫分析を高速かつ簡便に行える方法とその方法を利用する装置を提供する。

【構成】生体由来する抗原と抗体を保持する手段と、抗原と抗体を混合し反応させる手段と、抗原を電気泳動させる流路と、当該保持手段、当該混合手段、当該電気泳動手段を接続する流路手段と、当該保持手段、当該混合手段、当該電気泳動手段、当該流路手段内に存在する抗原あるいは抗体を移動させる手段を表面上に有する基板と、当該基板上に液体を含む物質を保持するための蓋と、移動手段、混合手段、電気泳動手段の動作の制御手段と、当該基板中あるいは外部に設けられた当該基板内での抗原の電気泳動速度に関する情報を出力する手段を用いて抗原と抗体との反応を検出することを特徴とする免疫分析装置を提供し、被測定対象の抗原を抗体と混合し、抗原の電気泳動速度の情報を得ることで免疫分析を行う。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】基板表面の凹形状部からなる生体由来する抗原と抗体を保持する手段と、基板表面の溝形状部からなる抗原と抗体を混合し反応させる手段と、基板表面の溝形状部からなる抗原を電気泳動させる流路と、当該保持手段、当該混合手段、当該電気泳動手段を接続する基板表面の溝形状部からなる流路手段と、当該保持手段、当該混合手段、当該電気泳動手段、当該流路手段内に存在する抗原あるいは抗体を移動させる手段を備えた基板と、当該混合手段、当該電気泳動手段、当該流路手段内に液体を含む物質を保持するための蓋と、移動手段、混合手段、電気泳動手段の動作を制御するための制御手段と、当該基板中あるいは外部に設けられた当該基板内での抗原の電気泳動速度に関する情報を出力する手段を用いて抗原と抗体との免疫反応を検出する方法。

【請求項 2】基板表面の凹形状部からなる生体由来する抗原と抗体を保持する手段と、基板表面の溝形状部からなる抗原と抗体を混合し反応させる手段と、基板表面の溝形状部からなる抗原を電気泳動させる流路と、当該保持手段、当該混合手段、当該電気泳動手段を接続する基板表面の溝形状部からなる流路手段と、当該保持手段、当該混合手段、当該電気泳動手段、当該流路手段内に存在する抗原あるいは抗体を移動させる手段を備えた基板と、当該混合手段、当該電気泳動手段、当該流路手段内に液体を含む物質を保持するための蓋と、移動手段、混合手段、電気泳動手段の動作を制御するための制御手段と、当該基板中あるいは外部に設けられた当該基板内での抗原の電気泳動速度に関する情報を出力する手段を用いて抗原と抗体との免疫反応を検出することを特徴とする免疫分析装置。

【請求項 3】請求項 2 記載の保持手段、混合手段、電気泳動手段、流路手段のいずれかが、除去加工、接合加工、添加加工、モールド加工で製作されていることを特徴とする免疫分析装置。

【請求項 4】請求項 1 記載の免疫分析方法において抗原と抗体が対向方向に電気泳動するような緩衝液で抗原と抗体を希釈して用いることを特徴とする免疫分析方法。

【請求項 5】請求項 3 記載の緩衝液においてゼラチンを含む緩衝液を用いることを特徴とする免疫分析方法。

【請求項 6】請求項 2 記載の基板において当該基板内の流路、電気泳動手段の少なくとも一つから  $10\mu\text{m}$  以上  $200\mu\text{m}$  以下の距離に電極を設け、その電位を変化させることにより、当該流路、当該電気泳動手段内部での流体、抗原、抗体の移動の速度及び方向あるいは流体中の抗原、抗体の壁への付着を制御することを特徴とする免疫分析装置。

【請求項 7】請求項 2 記載の基板において当該基板内の流路、電気泳動手段の断面形状が矩型であることを特徴とする免疫分析装置。

【請求項 8】請求項 2 記載の基板において抗原が混合手

段を通過した後に電気泳動手段に移動することを特徴とする免疫分析装置。

【請求項 9】請求項 1 記載の免疫分析方法において抗原と抗体の間の免疫反応の有無の判定を抗原の電気泳動速度の変化の有無により行うことを特徴とする免疫分析方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は血液中の赤血球、白血球、リンパ球、病原体、蛋白質などの抗原を抗体試薬と反応させ、反応量あるいは反応の有無により抗原の分離・分析、同定を行う免疫分析方法およびその装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来より、免疫分析は生化学や免疫学の研究において細胞の分離・分析や物質の精製・同定、更に臨床における診断・治療など広い分野で応用されている。免疫反応とは抗原と呼ばれる病原菌や毒素が体内に侵入した際に、血清中に抗体と呼ばれる蛋白質が多量に生じ、特異的に抗原と化学的に結合する反応であり、病原菌に体する防御反応として発見された。しかし、病原菌だけでなく、分子量が  $5000$  以上の分子の多くは抗原になりえることから免疫反応を利用して免疫原生をもつ分子全般の同定、分離、測定が行われている。また、体内に腫瘍細胞などの異常があると抗体が生じることや臓器移植の際にも移植者間の蛋白質などに適合性がない場合には免疫反応を起こすため医学的検査や治療において重要である。以下に免疫反応を利用した分析方法を示す。

【0003】細菌、酵母、白血球、赤血球などの微小粒子抗原はその表面に特定の抗体が結合すると凝集を起こすことが知られており、抗体試薬との混合により凝集が生じたかどうかを凝集物の沈降により確認することで抗原の同定が可能である。これは ABO 式血液型の検査などに用いられている。

【0004】可溶性抗原の免疫反応の検出法としてはゲル内で抗原と抗体を反応させて、不溶化した抗原の沈降反応を観察するゲル内免疫拡散法やその変形であるゲル中での免疫電気泳動法がある。

【0005】また、自動化した高速細胞分析装置として、あらかじめ蛍光物質で標識しておいた抗体を用い、細胞と抗体との免疫反応を行わせ、反応後の細胞に励起光を当て、蛍光の強度を測定し免疫反応の有無、量を測定するフローサイトメトリーがある。

【0006】また、微量の液体あるいは微粒子の反応検出方法に関する技術としてマイクロキャピラリチップを用いた分析装置の開発が行われている。これは数  $\text{cm}$  角の石英板や樹脂板に数  $10\mu\text{m}$  から  $100\mu\text{m}$  程度の細い溝（キャピラリ）を形成し、蓋をして、細い流路のネットワークをチップ中に形成したものであり、この流路

網中の液体を機械的ポンプあるいは電気浸透流によるポンプ作用により輸送し、混合させ反応を起こさせる。更にキャピラリー中での物質による移動速度の違いを利用して反応生成物を分離し、光や電氣的信号などにより反応生成物質を検出する。このような装置はマイクロ全分析システム( $\mu$ -TAS: total analysis system)と総称されている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】前述の沈降反応を利用した免疫分析法は、液体あるいはゲル中での抗原の沈降を待つ必要があり、数時間の長い時間を要する。また、自動化した装置ではなく、専門の知識を持った者しか行うことができない。

【0008】また、フローサイトメトリーは高速かつ自動化された装置であるが、蛍光標識した抗体試薬を用いなければならない、抗体試薬の種類が限定され、また抗体試薬が高額である。臨床の場合における診断・治療などでは多種の抗体を用いた免疫検査を行う必要があり、蛍光標識していない抗体を用いた免疫分析方法あるいは抗体の使用量がごく微量である免疫分析方法が必要とされていた。

【0009】

【課題を解決するための手段】基板表面の凹形状部からなる生体に由来する抗原と抗体を保持する手段と、基板表面の溝形状部からなる抗原と抗体を混合し反応させる手段と、基板表面の溝形状部からなる抗原を電気泳動させる流路と、当該保持手段、当該混合手段、当該電気泳動手段を接続する基板表面の溝形状部からなる流路手段と、当該保持手段、当該混合手段、当該電気泳動手段、当該流路手段内に存在する抗原あるいは抗体を移動させる手段を備えた基板と、当該混合手段、当該電気泳動手段、当該流路手段内に液体を含む物質を保持するための蓋と、移動手段、混合手段、電気泳動手段の動作を制御するための制御手段と、当該基板中あるいは外部に設けられた当該基板内での抗原の電気泳動速度に関する情報を出力する手段を用いて抗原と抗体との免疫反応を検出することを特徴とする免疫分析装置を提供し、被測定対象となる抗原を抗体と混合し、抗原の電気泳動速度の情報を得ることにより免疫分析を行う。

【0010】

【作用】抗体が細胞に結合すると細胞表面の帯電の量が変化するために、抗体との結合の有無あるいは結合量の違いにより抗原の泳動速度が変化したことから免疫反応を短時間で検出することができた。本発明では微小なキャピラリー内で反応を行うため、抗体試薬と被測定対象物は微量で済み、また0.2  $\mu$ m以上の大きさの光学的に検出できる抗原を分析する場合には、あらかじめ蛍光標識した高価な抗体試薬を用いる必要がなかった。また、移動手段、混合手段、電気泳動手段の動作は電氣的に制御することができるため、自動化が容易である。このよ

うに本発明により前述した高速化、自動化、抗体試薬の使用量、蛍光標識抗体試薬の使用などに関する課題が解決された。

【0011】

【実施例】本実施例で用いた装置の概略を図1に示す。101は石英であり、本基板上にはエッチングにより形成した102の抗体保持手段、103の抗体廃液保持手段、104の抗原保持手段、105の抗原廃液保持手段、106の混合手段、107の電気泳動手段、108の流路手段が配置される。分析に先立ち、保持手段、混合手段、電気泳動手段、流路手段内にはゼラチンペロナル緩衝液が満たされている。ゼラチンペロナル緩衝液を用いて抗体および抗原を希釈して、それぞれ102と104に導入する。102、103、104、105のそれぞれに差し入れた電極A(109)、電極B(110)、電極C(111)、電極D(112)の電圧を113の制御手段により制御し、114の抗原および115の抗体を移動させる。109に正の高電圧を与え、110を接地することにより102から103に向かう116の抗体の移動方向が得られ、112に正の高電圧を与え、111を接地することにより104から105に向かう117の抗原の移動方向が得られる。この抗原の移動方向は118の電気浸透流の移動方向とは逆向きである。109あるいは112の電位を変化させるか、あるいは110の電位を浮遊状態にすることで106の混合手段において抗原の移動方向を112から102へと変えることができる。また、電気泳動手段あるいは流路手段内での電気浸透流、抗原、抗体の移動速度や向きは119の電極の電圧を変化させることでも制御できる。抗体の含まれた緩衝液中に混合された抗原の107の電気泳動手段内での泳動速度情報は120の画像撮影装置により撮影され、121の画像処理装置により取り出される。

【0012】本実施例では、抗原に羊の赤血球を、抗体にはウサギ抗羊赤血球抗体を用いた。まず、図2は緩衝液によるマイクロキャピラリー内での抗原の移動特性の違いを示す。実験に先立ち保持手段、混合手段、電気泳動手段、流路手段内に緩衝液で希釈した抗原を注入し、109と110の電極間に電位差を与え、この電位差を50、100、150、200Vに変化させて抗原の泳動方向と速度を画像撮影装置により計測した。(a)代表的な生体細胞用緩衝液であるリン酸希釈生理食塩水を緩衝液に用いたときには抗原は正極から負極側に移動し、また、マイクロキャピラリーの側壁に引き寄せられやすいため移動速度はマイクロキャピラリーの中央と端で大きくことなり、分布形状に歪みが見られた。一方、(b)ゼラチンペロナル緩衝液では負極側から正極側に移動し、マイクロキャピラリー内での速度は中央でも端でも差が無いため正規分布的であった。正極から負極に向かって移動する抗体に対向させて抗原を混合するために、ま

た抗原の電気泳動速度の情報から免疫反応を検出するためにはゼラチンベロナル緩衝液を用いることが有効であることが分かる。

【0013】図3に混合手段の動作例を説明するため、図1の106の混合手段を拡大した写真を示す。前述の109と112の電圧をそれぞれ300Vと140Vにし、110と111を接地すると抗体は102から103に赤血球は104から105に向かって流れる（写真上段）。その後、110の電位をしばらくの間浮遊状態にすると、その間、赤血球は抗体の含まれる流路に流れ込み、混合される（写真中段）。110を再び接地すると赤血球は抗体と衝突しながら、102と103の間の電界により電気泳動される（写真下段）。

【0014】図4に免疫反応の有無による抗原の電気泳動速度の違いを示す。免疫実験の手順は以下の通りである。実験に先立ち保持手段、混合手段、電気泳動手段、流路手段内にゼラチンベロナル緩衝液を満たし、109に300V、112に140Vの電圧を与え、110と111を接地した。102にウサギ抗羊赤血球抗体を104に羊赤血球を注入すると、ウサギ抗羊赤血球抗体は102から103に移動し、羊赤血球は104から105に移動する。前述の106の混合手段の動作の説明と同様に110の電圧を変化させることにより羊赤血球を107の電気泳動手段に混合し、画像撮影手段120により羊赤血球の泳動速度を測定した。比較として測定した102にウサギ抗羊赤血球抗体を注入せず、ゼラチンベロナル緩衝液だけが102から103に流れる条件で抗原の羊赤血球を電気泳動させたときの速度分布

（上図）に対し、抗体のウサギ抗羊赤血球抗体を含むゼラチンベロナル緩衝液に混合させた羊赤血球を電気泳動させたときの速度分布（下図）は大きくばらついた。この変化から羊赤血球とウサギ抗羊赤血球抗体との間の免疫反応が起きていることが検出できた。この変化は負に帯電した抗原表面への抗体の結合により抗原の表面電荷が変化したためであり、羊赤血球以外の抗原にも起こることから、本発明に基づき白血球、リンパ球、細菌などの種々の抗原の免疫分析も可能になることが分かる。また、抗原の泳動速度の変化は本実施例ではCCDカメラによる実時間画像を観察しているだけでも1分以内ではっきりと確認できたことから、高速分析法であること

も示された。

【0015】

【発明の効果】以上に述べたとおり、本発明による免疫分析方法では微量の被測定試料と抗体試薬しか必要とせず、簡単な装置で高速で免疫反応を検出することができ、生化学、免疫学、細胞生物学などの生命化学で広く用いられる免疫分析の簡易化・高速化に貢献する。また蛍光化した抗体を必ずしも用いる必要がないため多種の抗原抗体反応に利用でき、特に臨床の場における診断・治療に応用すれば病理あるいは生体適合性などの検査時間の大幅な短縮ができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明による装置の概略図

【図2】緩衝液によるキャピラリー内での抗原の移動特性の違いを示す図

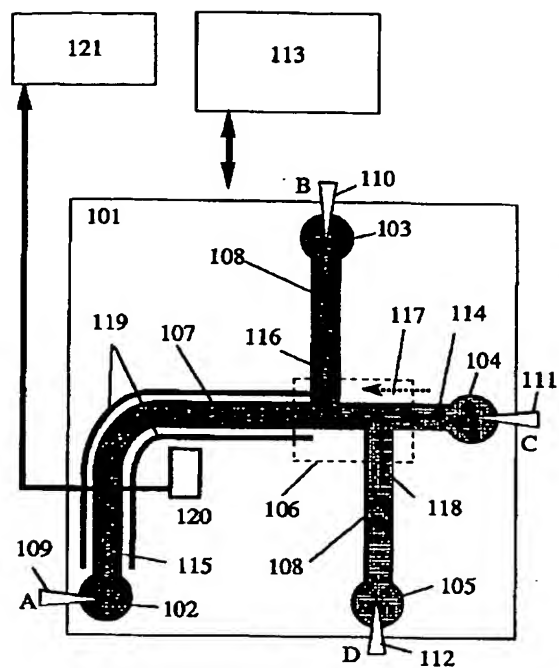
【図3】混合手段の動作例を示す図

【図4】免疫反応の有無による抗原の電気泳動速度の違いを示す図

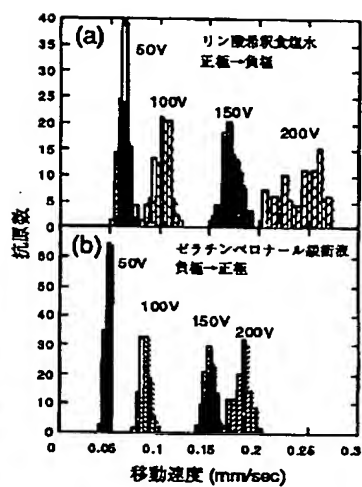
【符号の説明】

- 101 石英
- 102 抗体保持手段
- 103 抗体廃液保持手段
- 104 抗原保持手段
- 105 抗原廃液保持手段
- 106 混合手段
- 107 電気泳動手段
- 108 流路手段
- 109 電極A
- 110 電極B
- 111 電極C
- 112 電極D
- 113 制御手段
- 114 抗原
- 115 抗体
- 116 抗体の移動方向
- 117 抗原の移動方向
- 118 電気浸透流の移動方向
- 119 電極
- 120 画像撮影装置
- 121 画像処理装置

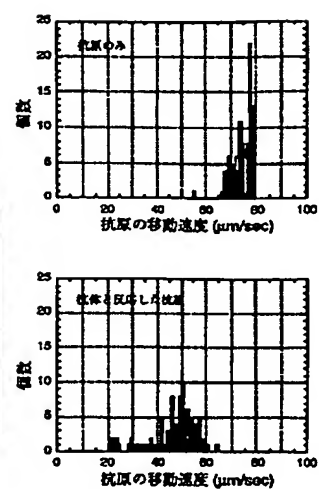
【図1】



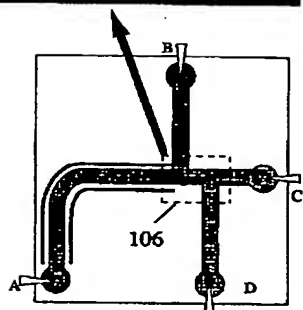
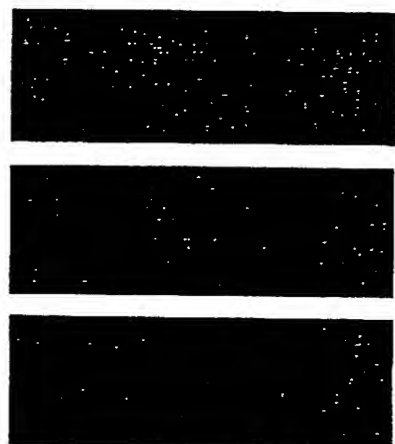
【図2】



【図4】



【図3】



フロントページの続き

(72)発明者 氏家 建和  
埼玉県鶴ヶ島市上広谷 1-1 リーリエ岩本  
305

(72)発明者 奥田 智子  
東京都練馬区旭丘 2-41-2 江古田パーク  
マンション 418  
(72)発明者 堀池 靖浩  
東京都保谷市東伏見 3 丁目 2 番地 12 号  
F ターム(参考) 4B029 AA07 FA05 FA10